

## Résumé

L'association d'une légumineuse cultivée en haies entre les rangs de caféiers sera plus efficace si on peut optimiser la fixation biologique d'azote atmosphérique (FBNA).

Des méthodes d'écologie microbienne ont été exploitées pour déterminer les conditions favorables à la croissance des souches de *Rhizobium* indigènes et importées, ainsi que pour rechercher les amendements à effectuer pour améliorer la croissance des plantes et la FBNA in situ.

Des études ont été ensuite réalisées pour définir l'évolution de l'activité fixatrice d'azote dans le temps compte tenu du mode de gestion de l'association culturale légumineuse-caféier.

Les techniques de mesure isotopiques ont été utilisées pour apprécier les flux d'azote dans le sol et dans la plante, ainsi que les bénéfices que procure au caféier la FBNA par la légumineuse cultivée en haie dans la plantation.

## Abstract

Growing a legume plant in hedges in the coffee tree interrows will be most effective if we are able to improve the biological nitrogen fixation (BNF).

Microbiological methods were used to determine the best conditions for the growth of native or imported *Rhizobium* strains and find the soil amendments required to improve plant growth and BNF in the field.

Studies were then carried out to determine variations in nitrogen fixation activity over time, taking into account how the legume-coffee tree combination was managed.

Isotopic measurement techniques were used to evaluate nitrogen flow in the soil and in the plant, and assess the benefit to coffee trees of BNF by legumes grown as hedges in the plantation.

## Resumen

La asociación de una leguminosa cultivada en seto entre las hileras de cafetos será más eficaz si estamos capaces de mejorar la fijación biológica del nitrógeno atmosférico (FBNA).

Se explotaron métodos de la ecología microbiana para determinar las condiciones favorables para el crecimiento de las cepas de *Rhizobium* indígenas e importadas, así como para buscar los mejoramientos a realizar para mejorar el crecimiento de las plantas y la FBNA in situ. Luego se realizaron estudios para definir la evolución de la actividad fijadora de nitrógeno en el tiempo, considerándose el modo de manejo de la asociación de cultivo de leguminosa-café. Se utilizaron las técnicas de medida isotópicas para estimar los flujos de nitrógeno en el suelo y en la planta, así como las ganancias que proporciona al café la FBNA por la leguminosa cultivada en seto en la plantación.

# Effets bénéfiques de l'association *Leucaena-Rhizobium* sur le caféier au Burundi

Snoeck D.

CIRAD-CP, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, France

La productivité des caféiers est liée aux quantités de matière organique et d'azote disponibles dans le sol (Snoeck, 1961 ; Carvajal, 1984). Au Burundi (carte), le paillage des caféiers, avec des graminées ou des résidus de récolte prélevés dans les jachères alentour, apporte ces éléments ; ce qui a aussi l'avantage de protéger le sol contre l'érosion et l'évaporation en saison sèche.

Malheureusement, les bas-fonds des vallées ou les sommets des collines, où le planteur allait chercher des herbes pour pailler

ses caféiers, sont de plus en plus exploités. Il doit produire lui-même son paillis, ce qui exige beaucoup de main-d'œuvre et provoque un transfert de fertilité des parcelles environnantes vers les caféiers.

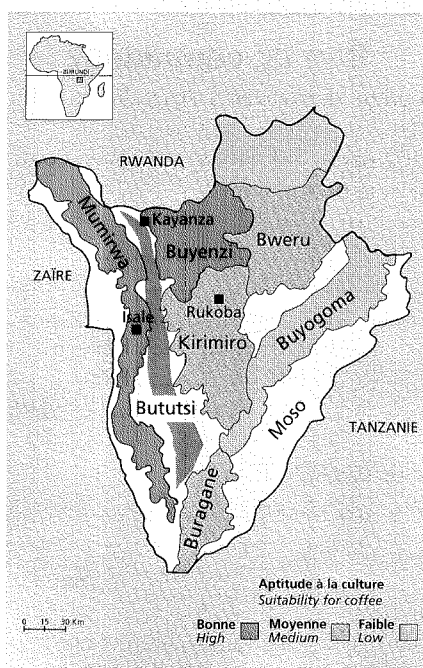
La plantation d'une légumineuse en haie dans les interlignes des caféiers réduit la jachère et la main-d'œuvre, transfère la fertilité tout en conservant les avantages du paillis. Cette légumineuse ne doit pas concurrencer les caféiers pour la lumière, l'eau et les éléments minéraux (Snoeck, 1961). Elle doit aussi produire suffisamment de matière végétale pour protéger le sol contre l'érosion et l'évaporation en saison sèche (Carvajal, 1984 ; Gaie et Flémal, 1988).

Mais la fixation biologique d'azote varie selon les régions. L'absence de fixation d'azote est liée à une faible nodulation et à des sols généralement acides et désaturés en bases échangeables. L'influence de la légumineuse sur les rendements des caféiers dépend de sa capacité à fixer l'azote atmosphérique. La quantité d'azote fixé dépend du choix des deux partenaires de la symbiose : la souche de *Rhizobium* et la plante.

Snoeck *et al.*, 1994 ont démontré qu'au Burundi l'utilisation de légumineuses est économiquement rentable, même en cas de légère concurrence entre les deux plantes associées, grâce à l'économie de main-d'œuvre que procure l'association (photo 1).

Un système associatif stable et efficace demande :

- une légumineuse adaptée à l'association ;
- une fixation biologique optimale d'azote ;





- un transfert de l'azote fixé par la légumineuse au caféier ;
- des techniques culturales adaptées aux contraintes liées à l'association.

Ces quatre points ont été étudiés à partir d'essais réalisés en laboratoire et *in situ* dans les trois principales régions caféières (tableau 1), dans les centres de :

- Isale – région du Mumirwa – pluviométrie suffisante, mais sols très érodés à cause des fortes pentes de cette région ;
- Rukoba – région du Kirimiro – pluviométrie insuffisante et sols fortement acides et désaturés ;
- Kayanza – région du Buyenzi – bonne pluviométrie et sols moyennement saturés en éléments minéraux et moyennement acides.

## Choix d'une légumineuse adaptée à l'association

Les caféiers peuvent être associés à des légumineuses annuelles (*Mimosa*, *Stylosanthes*, *Tephrosia* ou *Crotalaria*), ou des légumineuses pluriannuelles (*Desmodium*, *Leucaena* ou *Flemingia*) (Bouharmont, 1979).

Trois légumineuses ont été testées :

- le *Desmodium* produit une biomasse abondante ; ce qui apporte de la matière organique, mais dans beaucoup de régions la pluviométrie est déficitaire. Dans ce cas, il concurrence les caféiers pour l'eau ;



Photo 1. Association caféiers – *Leucaena*.  
Coffee with *Leucaena*.

- le *Leucaena* et le *Flemingia* ne concurrencent pratiquement pas les caféiers. Ils jouent aussi un rôle antiérosif grâce à leur système racinaire pivotant et profond. Cependant, le *Flemingia*, récemment introduit au Burundi, semble assez délicat à installer. Deux espèces de *Leucaena* sont recommandées : au-dessus de 1 500 m, le *Leucaena diversifolia*, en dessous, le *Leucaena leucocephala*.

Au cours des prospections, on a repéré un *Leucaena diversifolia* très performant du point de vue de la fixation d'azote et sur les racines duquel on a pu isoler une souche de *Rhizobium* qui lui semble adaptée. Comme la plupart des plantations de caféiers sont situées à 1 500 m d'altitude ou plus, nous avons utilisé cette légumineuse et cette bactérie pour étudier les problèmes de fixation et de transfert d'azote.

## Optimisation de la fixation d'azote (N<sub>2</sub>)

Pour améliorer la fixation de N<sub>2</sub>, des études ont été menées pour identifier la souche de *Rhizobium* qui nodule le *Leucaena*, et pour rechercher sa présence et sa compétitivité dans les divers sols de culture du caféier. Les facteurs qui améliorent le développement de cette souche ont ensuite été étudiés en laboratoire sur la bactérie seule (*ex planta*), en serre ou en champ lorsqu'elle est associée au *Leucaena*.

### Identification de la souche de *Rhizobium* isolée sur *Leucaena* au Burundi

L'information du génome bactérien s'exprime par la structure des protéines, la composition chimique des éléments cellulaires, ses caractères phénotypiques, morphologiques, enzymatiques et nutritionnels. Pour identifier les bactéries, plusieurs méthodes sont utilisées ; chacune apporte un ou plusieurs éléments d'information sur la position taxinomique de la bactérie (Graham *et al.*, 1991).

La souche de *Rhizobium* IRAT K 156, isolée au Burundi, ne fait partie d'aucun groupe connu (photo 2). Elle se rapproche d'une autre souche nodulant le *Leucaena* au Bhoutan (KL4) et d'un groupe contenant deux *Rhizobium phaseoli* et la souche de référence de *Rhizobium tropici* (CIAT 899).

### Compétitivité de la souche de *Rhizobium* isolée au Burundi

La souche de *Rhizobium* IRAT K 156 a été recherchée dans les différents sols du Burundi et sa compétitivité a été comparée à celle de deux espèces de *Leucaena* couramment utilisées. Trois *Leucaena* (deux *L. diversifolia* et un *L. leucocephala*) ont été semés dans trois sols provenant des trois centres d'essais. Pour chaque espèce et pour chaque sol, trois traitements ont été appliqués :

- pas d'inoculation (nodulation naturelle à partir des souches existantes dans le sol) ;
- inoculation de 1 ml / sachet de solution contenant 10<sup>3</sup> bactéries (IRAT K156) par ml ;
- inoculation de 1 ml / sachet de solution contenant 10<sup>9</sup> bactéries (IRAT K156) par ml.

Après 4 mois, la souche locale a été détectée à l'aide d'un sérum créé spécifiquement pour cette souche sur 30 nodosités par traite-

Tableau 1. Caractéristiques des sols\* des trois centres de recherche.  
Soil characteristics\* at the three research centres.

Type d'analyse Type of analysis	Unité Unit	Isale	Rukoba	Kayanza	
Argile + limon fin Clay + fine loam	%	76,6	52,9	63,7	
pH (H <sub>2</sub> O)		4,80	4,50	5,50	
pH (K Cl)		4,10	4,10	4,30	
C	%	1,85	1,53	1,70	
N total (Kjeldahl) Total N (Kjeldahl)	%	0,20	0,12	0,15	
P (méthode Olsen-Dabin) P (Olsen-Dabin method)	ppm	23	37	175	
Ca <sup>++</sup>	Acétate d'ammonium (à pH=7) Ammonium acetate (at pH=7)	me/100 g	0,75	0,07	4,80
Mg <sup>++</sup>		me/100 g	0,77	0,06	1,50
K <sup>+</sup>		me/100 g	0,07	0,06	0,80
Na <sup>++</sup>		me/100 g	0,09	0,07	0,05
Al <sup>+++</sup>		me/100 g	2,53	3,42	0,25
H <sup>+</sup>	me/100 g	0,20	0,31	0,11	
CEC	me/100 g	11,91	13,83	12,80	
Saturation en bases Base saturation	%	14	2	55	
Saturation aluminique Aluminium saturation	%	21	25	2	

\* couche arable (0 à 30 cm)/\* arable layer (0 to 30 cm)



ment et le pouvoir de fixation d'azote a été mesuré. Les résultats de l'analyse du pourcentage de nodosités comportant la souche dans les différents traitements sont représentés figure 1.

Le pouvoir de fixation d'azote a été mesuré par la méthode de l'activité réductrice d'acétylène (ARA) décrite par Hardy *et al.* (1968) (figure 2). On constate une très bonne corrélation entre les mesures de la quantité de nodosités contenant la bactérie et l'activité fixatrice d'azote ; en particulier chez le *Leucaena diversifolia*. Ces deux facteurs sont donc fortement corrélés.

La souche de *Rhizobium* locale (IRAT K156) est donc présente et compétitive dans les sols des trois régions.

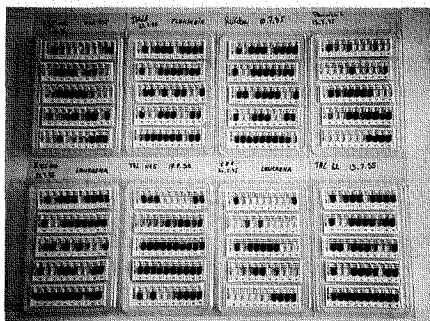
### Influence des facteurs du milieu sur la multiplication et la croissance des bactéries

Le comportement de la souche de *Rhizobium* IRAT K 156 vis-à-vis de l'acidité et des teneurs en phosphore et en aluminium, a été étudié dans un milieu de culture à base de *Yeast Extract Mannitol* (YEM). Des traitements parallèles ont été réalisés sur une souche de référence spécifique au *Leucaena* importée d'Australie : la souche TAL 582.

La comparaison des traitements est basée sur la densité optique du milieu de culture en relation avec la multiplication et la croissance des souches.

Un pH de 5,0 constitue un minimum indispensable pour assurer la croissance des deux souches (figure 3). Au-dessus de ce seuil, la souche TAL 582 atteint sa croissance optimale, tandis que la souche K 156 reste sensible à l'augmentation de pH jusqu'à 6,5.

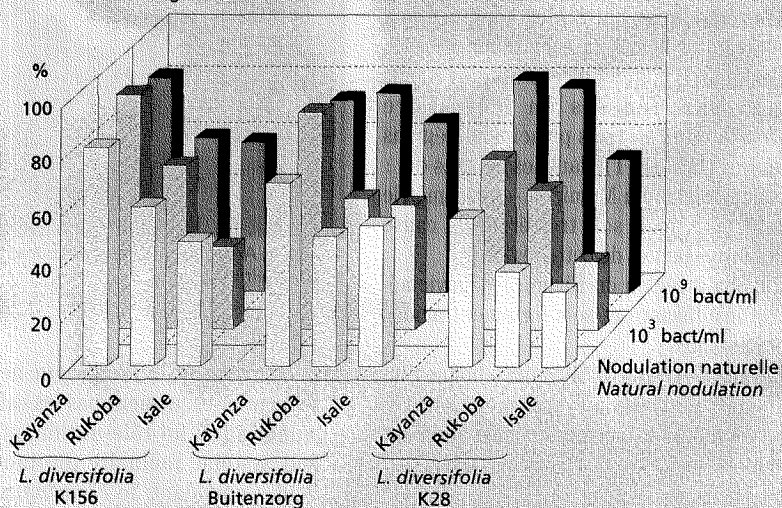
En ce qui concerne l'effet du phosphore, la dose de 114 ppm constitue la dose normale, les quantités inférieures simulent une carence en cet élément (figure 4). On observe que la croissance de K 156 est forte-



D. Smeek

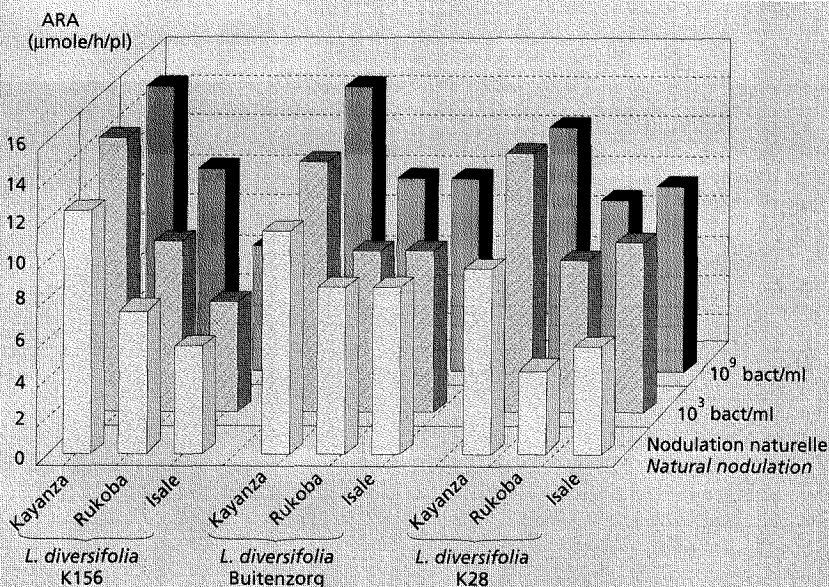
**Photo 2.** Exemple de caractérisation des souches de *Rhizobium*. / Example of *Rhizobium* strain characterisation.

% de nodosités contenant la bactérie  
% of nodules containing the bacterium



ment et le pouvoir de fixation d'azote a été mesuré. Les résultats de l'analyse du pourcentage de nodosités comportant la souche dans les différents traitements sont représentés figure 1.

**Figure 1.** Taux de nodosités contenant IRAT K156 de *Leucaena* cultivés dans des sols provenant de trois régions avec ou sans inoculation. / Proportion of nodules containing IRAT K156 on *Leucaena* grown in soils from three regions with or without inoculation.



ment et le pouvoir de fixation d'azote a été mesuré. Les résultats de l'analyse du pourcentage de nodosités comportant la souche dans les différents traitements sont représentés figure 1.

**Figure 2.** Activité fixatrice d'azote (mesurée par l'ARA) de *Leucaena* cultivés dans des sols provenant de trois régions différentes avec ou sans inoculation. / Nitrogen fixing activity (measured by ARA) of *Leucaena* grown in soils from three different regions with or without inoculation.



ment ralenti par le manque de phosphore. Les mêmes réponses s'observent pour la souche TAL 582 mais elle est moins sensible à la carence en phosphore.

Pour l'effet de l'aluminium, la dose de 0 ppm constitue la dose normale, les quantités supérieures simulent une toxicité en cet

élément (figure 5). La toxicité aluminique ralentit fortement la croissance de K 156 et en empêche même la multiplication. Ici aussi, TAL 582 ne réagit qu'à de fortes contraintes.

La souche de *Rhizobium* locale (K 156) est plus exigeante pour l'acidité du milieu

et plus sensible à la carence en phosphore et à la toxicité aluminique que la souche TAL 582. Cependant, les deux bactéries nécessitent des milieux de croissance qui ne sont pas trop acides, sans toxicité aluminique et avec une teneur minimale en phosphore.

Comme la plupart des sols de culture du caféier au Burundi ne remplissent pas ces conditions, ceci peut expliquer l'hétérogénéité de la nodulation observée dans les enquêtes.

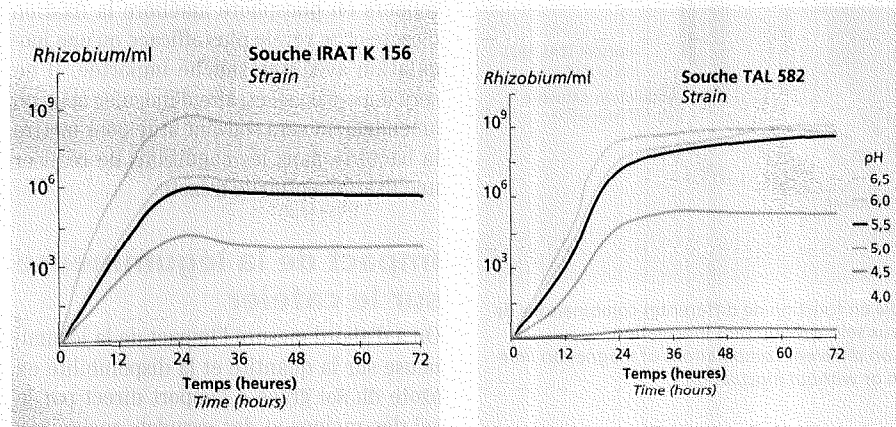
### Influence des amendements sur la biomasse des légumineuses et la quantité d'azote fixé

Nous avons étudié l'influence de la correction du sol par des amendements phosphaté, calco-magnésien et la combinaison des deux sur la biomasse, la nodulation et la quantité d'azote fixé du couple *Rhizobium/Leucaena*. Les traitements ont été répétés pour les sols de Rukoba et d'Isale. Les doses de chaux magnésienne à apporter ont été calculées en fonction des quantités d'aluminium échangeable à neutraliser par la méthode de Kamprath (1970). Les doses de phosphate (super triple) ont été calculées sur la base des niveaux de cet élément dans le sol pour atteindre (ou dépasser) 50 ppm de P échangeable dans le sol. A Rukoba, un apport de 4,2 g de chaux et de 0,2 g de phosphate, par sachet, a fait monter le pH à 5,3 ; la saturation en bases à 32 % ; le Ca à 1,6 méq/100 et les teneurs en P à 100 ppm. Tandis qu'à Isale, un apport de 3,1 g de chaux et de 0,4 g de phosphate a fait monter le pH à 6,1 ; la saturation en bases à 93 % ; les teneurs en Ca à 3,2 méq/100 et les teneurs en P à 135 ppm. Les biomasses moyennes des plants de *Leucaena* âgés de 4 mois sont présentées dans la figure 6.

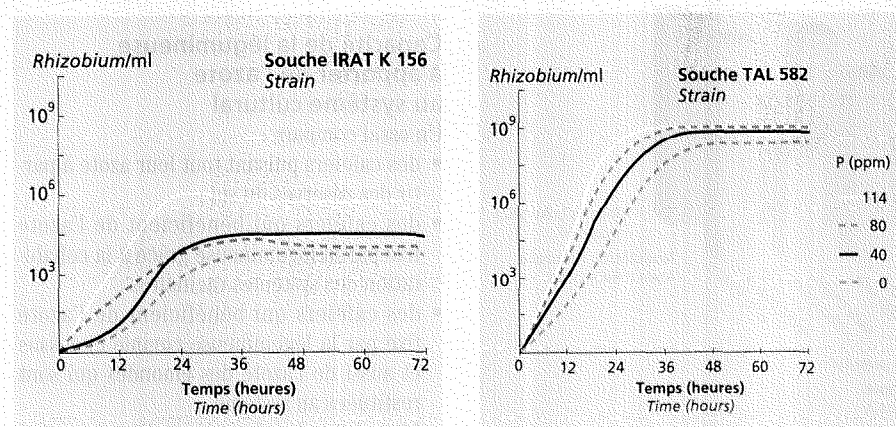
Dans le sol de Rukoba, très acide ( $pH_{H_2O} = 4,5$ ) et désaturé (saturation en bases = 2 %), le chaulage et le phosphore ont un effet très net. La combinaison des deux amendements donne les meilleurs résultats. Dans le sol d'Isale, moins acide ( $pH_{H_2O} = 4,8$ ) et moins désaturé (saturation en bases = 14 %), l'apport de chaux seule permet d'obtenir des rendements équivalents à la combinaison des deux amendements.

Les quantités d'azote fixées ont pu être obtenues par les mesures des biomasses, des taux d'azote total et les taux d'azote fixé (figure 7) pour des plants âgés de 4 mois.

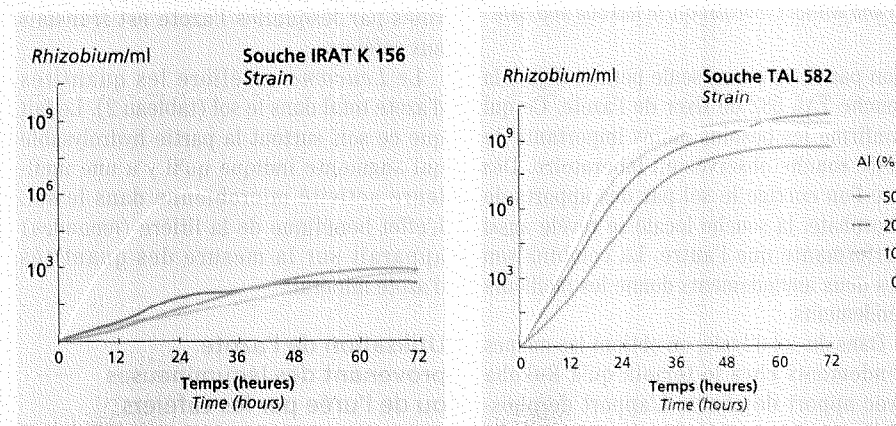
Dans du sol de Rukoba, le *Leucaena* ne fixe pratiquement pas d'azote. Une correc-



**Figure 3.** Croissance des souches IRAT K 156 et TAL 582 dans différents milieux de culture (YEM) dont le pH varie de 4,0 à 6,5. / Growth of strains IRAT K 156 and TAL 582 in different culture media (YEM) of pH varying from 4.0 to 6.5.

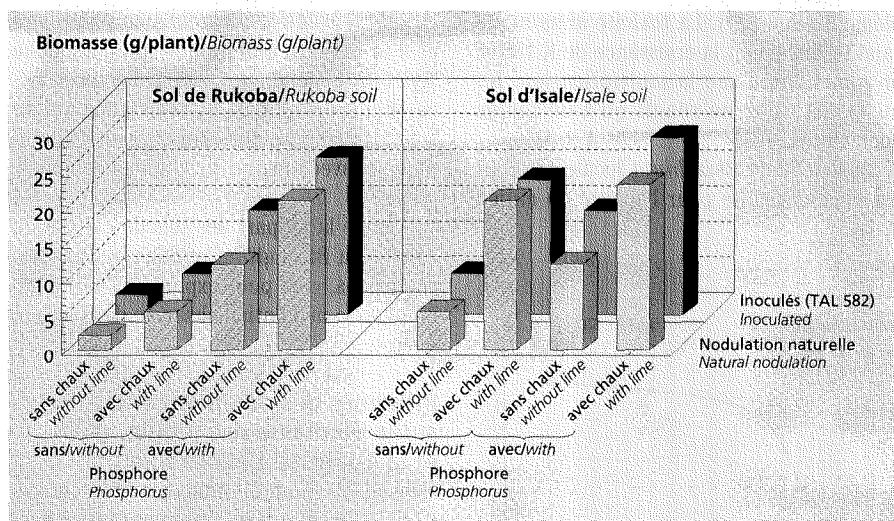


**Figure 4.** Croissance des deux souches en fonction de différentes doses de phosphore en milieu YEM à pH = 5,5. / Growth of the two strains depending on different phosphorus rates in the YEM medium at pH = 5.5.

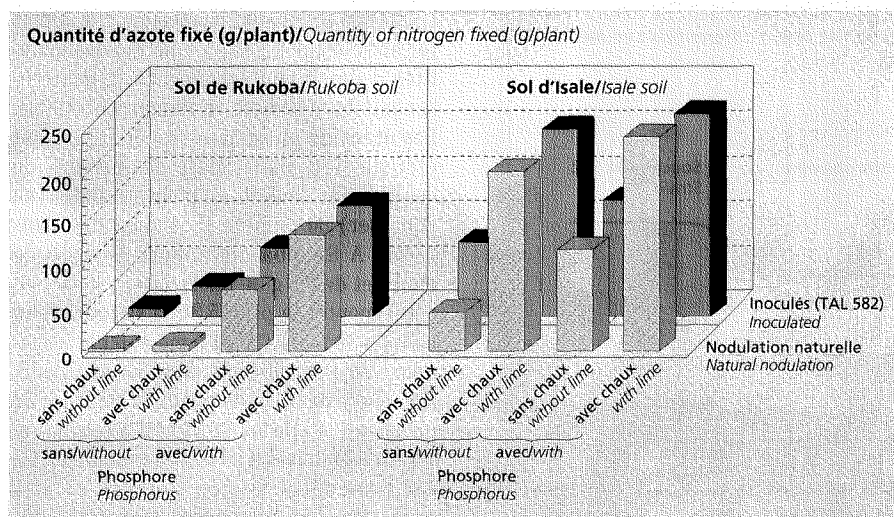


**Figure 5.** Croissance des deux souches en fonction de différentes doses d'aluminium en milieu YEM à pH = 5,5. / Growth of the two strains depending on different aluminium rates in the YEM medium at pH = 5.5.





**Figure 6.** Biomasse produite par le *Leucaena diversifolia* en fonction de différentes combinaisons de doses de chaux magnésienne et de phosphore dans deux sols, avec ou sans inoculation. Biomass produced by *Leucaena diversifolia* depending on different combinations of magnesian lime and phosphorus application rates in the two soils, with or without inoculation.



**Figure 7.** Quantité d'azote fixé par des plants de *Leucaena diversifolia* en fonction de différentes combinaisons de doses de chaux magnésienne et de phosphore, avec ou sans inoculation, dans les sols de Rukoba et d'Isale. Quantity of nitrogen fixed by *Leucaena diversifolia* plants depending on different combinations of magnesian lime and phosphorus application rates, with and without inoculation, in Rukoba and Isale soils.

Les taux d'azote ont été mesurés par la méthode des abondances isotopiques naturelles d'azote qui donne le pourcentage global d'azote fixé sur toute la période de croissance. Cette méthode est basée sur le fait que les pourcentages d'isotopes  $^{15}\text{N}$  de l'air et du sol sont différents. Donc, lorsque la légumineuse est capable de fixer l'azote atmosphérique, elle aura un taux d'isotopes  $^{15}\text{N}$  intermédiaire qui sera d'autant plus proche de celui de l'air que son pouvoir fixateur est grand (Fried et Middleboe, 1977). La validité de cette méthode pour des plantes ligneuses a été démontrée par Domenach (1987).

tion par de la chaux seule permet déjà à la souche TAL 582 de fixer de l'azote. Ce qui confirme les besoins moins importants de cette souche observés en laboratoire. Dès que l'on corrige le sol par des apports de phosphate, la souche locale se révèle aussi performante que l'autre. La combinaison des deux amendements donne les meilleurs rendements.

Dans du sol d'Isale, on obtient les mêmes rendements chez le témoin qu'à Rukoba avec apport de chaux. L'apport de phosphate rend la souche locale aussi performante que la souche importée. Le phosphate constitue moins un facteur limitant

et donc l'apport de chaux seule permet d'obtenir les mêmes résultats que la combinaison chaux plus phosphore à Rukoba. La combinaison des deux amendements ne produit pas d'amélioration significative ; ce qui montre que l'on a pratiquement atteint les seuils requis dans ce sol.

Une correction de l'acidité du sol et des teneurs en phosphore améliore la fixation d'azote et se révèle plus efficace qu'une inoculation avec une souche importée. Il ne sera donc pas nécessaire d'inoculer mais un amendement sera souvent utile pour mettre la bactérie dans les conditions de réaliser une fixation optimale d'azote.

## Impact de la légumineuse sur le caféier

On a d'abord mesuré l'impact de la légumineuse sur la quantité et la disponibilité en azote du sol grâce à l'apport direct par le sol des racines et des exsudats racinaires, et à l'apport par les émondes. Puis on a mesuré l'utilisation de l'azote par les caféiers grâce à l'étude des flux d'azote.

## Capacité de la légumineuse à apporter de l'azote au système cultural

Un essai compare :

- des caféiers puisant tout leur azote à partir des réserves du sol ;
- des caféiers qui bénéficient de l'azote fixé par la légumineuse grâce à la cohabitation des systèmes racinaires ;
- des caféiers qui bénéficient de l'azote fixé par la légumineuse comme ci-dessus et aussi de l'azote des émondes qui sont restituées au système.

L'analyse des fractions d'azote a été faite selon la méthode décrite par Egoumenides *et al.* (1990). Les traitements ont été choisis pour distinguer les différentes voies par lesquelles l'azote est transmis aux caféiers.

Le *Leucaena* améliore les quantités d'azote total dans le sol (tableau 2). Le fait que ce soit surtout la partie hydrolysable qui augmente indique qu'il y a une meilleure activité microbienne dans le sol. L'effet bénéfique de la litière (émondes) apparaît sur la mesure des quantités d'azote minéral.

## Utilisation de l'azote provenant des légumineuses ou de l'urée par les caféiers

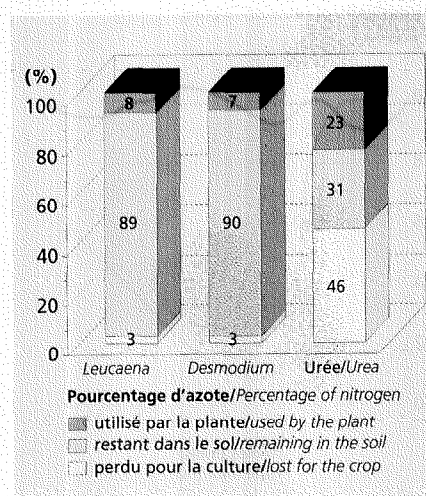
Pour mesurer comment les caféiers utilisent l'azote apporté par les émondes de légumineuses, une litière de *Leucaena*,



préalablement enrichie en isotopes  $^{15}\text{N}$ , a été déposée aux pieds de quelques caféiers isolés par des tôles enfoncées dans le sol. Le parcours de l'azote a été suivi et les taux d'azote absorbé par la plante et restant dans le sol, mesurés. On a fait de même avec une litière de *Desmodium* et on a comparé ces deux sources d'azote végétal à de l'azote apporté sous forme d'urée. Ces traitements ont été comparés à des caféiers qui puisent tout leur azote à partir des réserves du sol. Ce traitement témoin nous fournit également l'abondance isotopique naturelle d'azote dans le sol et dans la plante. Les litières et l'urée sont restées une année. Ensuite, des échantillons de sol ont été prélevés puis les caféiers ont été arrachés, pesés et analysés.

En une année, les caféiers ont utilisé 7 à 8 % de l'azote fourni par les émondes et près de 23 % de l'azote apporté par l'urée (figure 8). Près de 90 % de l'azote des deux sources végétales sont restés immobilisés dans le sol et 31 % seulement de l'azote apporté par

l'urée. Le reste est perdu pour les cultures (soit respectivement 3,3 et 46 %).



**Figure 8.** Effet d'une litière de légumineuses ou de l'urée sur les flux d'azote dans le caféier et dans le sol.  
Effect of legume litter or urea on nitrogen flow in the coffee tree and in the soil.

Pour mesurer l'effet résiduel de l'azote de ces trois sources, on a replanté de jeunes caféiers que l'on a laissé croître pendant une année. Les caféiers exploitent encore 4 à 5 % de l'azote apportés par les émondes de légumineuses ou par l'urée (figure 9). Mais l'azote du *Leucaena* se minéralise beaucoup plus lentement que celui du *Desmodium*, tandis que l'azote provenant de l'urée n'est pratiquement plus lessivé. Il semble que, dans ce dernier cas, on ait pratiquement atteint l'équilibre avec l'azote du sol.

On peut donc dire que l'utilisation des légumineuses enrichit le sol en azote. Celui fourni au sol par les légumineuses est conservé principalement sous forme hydrolysable (donc disponible pour les cultures). Restituer les émondes au système augmente le pouvoir de minéralisation du sol et les quantités d'azote fixé par la plante ; la qualité de la matière organique dépend du type de légumineuse utilisée : les légumineuses arbustives ont un arrière-effet plus durable.

**Tableau 2.** Influence de la culture de légumineuses sur les teneurs en N total et sur les fractions azotées du sol.  
Effect of legume cultivation on total N contents and on the nitrogen fractions of the soil.

Traitement Treatment	N total (ppm) Total N (ppm)	N nh(ppm) nh N (ppm)	N hydrolysable Hydrolysable N			N mineral Mineral N	
			nd (ppm)	d (ppm)	hd/d	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	NO <sub>3</sub>
Lutte antiérosive (témoin) Erosion control (control)	1 783 b	336	915	532	1,72	9,6	14,8 b
<i>Leucaena</i> sans émondes <i>Leucaena</i> without prunings	1 907 ab	366	981	560	1,75	11,0	14,4 b
<i>Leucaena</i> avec émondes <i>Leucaena</i> with prunings	1 905 ab	358	989	558	1,77	11,5	19,0 a
<i>Desmodium</i> avec émondes <i>Desmodium</i> with prunings	2 009 a	368	1 053	588	1,79	13,4	21,5 a
F. Obs./Obs F.	3,4 *	0,3 NS	2,0 NS	1,7 NS	0,6 NS	2,3 NS	5,4 **
C.V. (%)	6	22	10	8	6	23	21

Echantillons de sol de 0 à 10 cm de profondeur / Soil samples taken from a depth of 0 to 10 cm

d : distillable

nd : non distillable

nh : non hydrolysable

a, b, ... des lettres identiques indiquent des observations qui ne sont pas significativement différentes entre elles par la méthode de Newman-Keuls. / a, b, ... the same letters indicate observations that are not significantly different from each other by the Newman-Keuls method.

NS : Aucune différence significative ( $P > 5\%$ ) / NS: No significant difference ( $P > 5\%$ )

C.V. : coefficient de variation / coefficient of variation

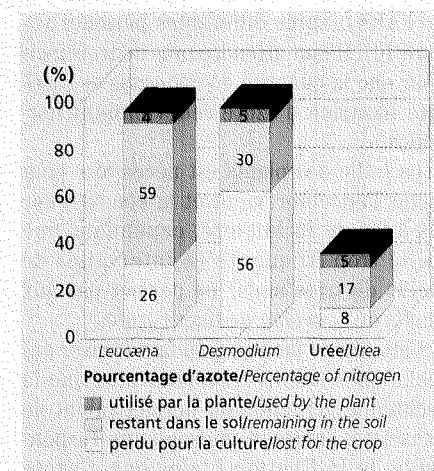
F. Obs. : valeur observée (test de Fischer-Snedecor) / Obs F. : observed value (Fischer-Snedecor test)

\* Test de Fischer significatif à  $P \leq 0,05$  (5 %) / \*Fischer test significant at  $P \leq 0,05$  (5%)

\*\* Test de Fischer significatif à  $P \leq 0,01$  (1 %) / \*\* Fischer test significant at  $P \leq 0,01$  (1%)

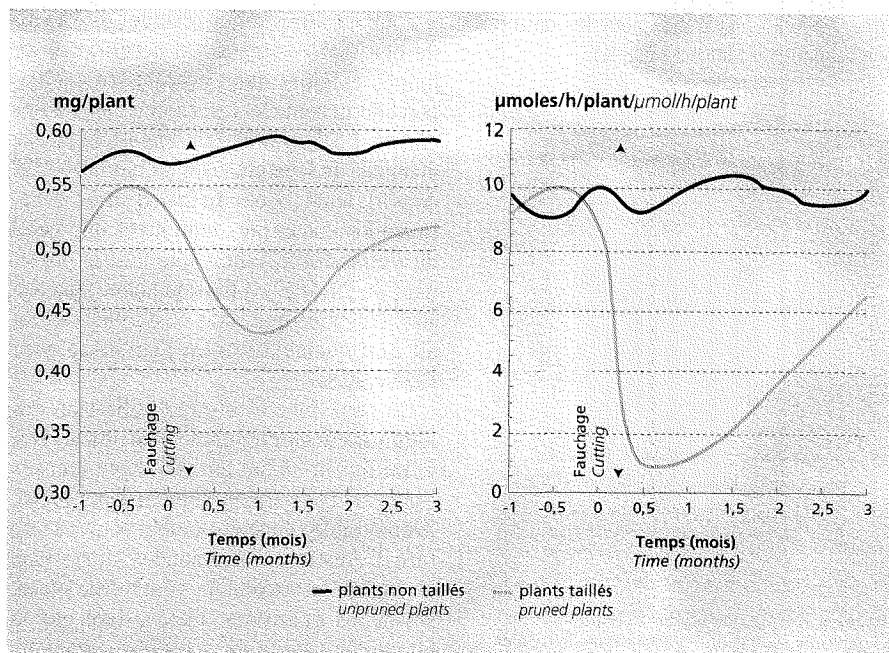
## Effet de la coupe des plants de *Leucaena* sur la fixation d'azote

Nous avons étudié l'effet de la coupe des plants de *Leucaena* sur le nombre et le poids des nodosités et sur l'activité fixatrice d'azote (mesurée par la méthode de



**Figure 9.** Utilisation de l'azote restant dans le sol un an après avoir retiré la litière de légumineuses ou arrêté l'apport d'urée.  
Use of nitrogen remaining in the soil a year after removal of legume litter or halting of urea applications.





**Figure 10.** Évolution du poids de nodosités et de l'activité réductrice d'azote pour des plants de légumineuses non taillés et des plants dont on a coupé la partie aérienne à 20 cm du sol.  
Variation in nodule weight and nitrogen reducing activity for unpruned plants and plants cut 20 cm from the ground.

l'ARA). Des plants de *Leucaena* ont été cultivés en vase de végétation pendant un an et demi. Certains plants ont été coupés à 10 cm au-dessus du sol tous les quatre mois (plants taillés), tandis que d'autres plants n'ont pas été coupés (plants non taillés).

Lorsqu'on coupe la partie aérienne des plantes, on constate une chute importante de la quantité de nodosités et de l'activité fixatrice d'azote (mesurée par la méthode de l'ARA), après différentes périodes (figure 10). Il faut attendre près de trois mois pour que la quantité de nodosités et l'activité fixatrice d'azote redeviennent normales.

La taille des plants est nécessaire pour éviter l'encombrement et la concurrence vis-à-vis de la lumière, cependant une taille trop fréquente (à intervalles de moins de trois mois) ne permet pas aux plants de *Leucaena* de fixer l'azote.

Cette étude montre qu'il faut trouver des techniques, moins traumatisantes que la technique actuelle, qui permettraient de conserver l'activité microbienne responsable de la fixation biologique d'azote (maintien d'une branche tire-sève, taille plus haute, etc.) et, ainsi, éviter que la plante ne soit obligée de puiser dans ses réserves pour produire de nouvelles pousses.

## Conclusion

Le *Leucaena* convient à l'association avec le caféier, car il apporte de la matière organique et des éléments fertilisants. Il protège le sol contre l'érosion et l'évaporation pendant la saison sèche.

Toutes les souches de *Rhizobium* associées au *Leucaena* ont besoin que l'on améliore la fertilité du sol pour être efficaces et, une fois la correction du sol réalisée, les souches natives présentent les mêmes performances que les souches importées. Si l'on utilise cette plante, il ne sera pas nécessaire de l'inoculer mais une fertilisation adéquate sera nécessaire. Des doses et des niveaux de correction en phosphore et en calcium ont pu être définis.

La correction du sol favorise l'activité microbienne associée à la fixation biologique d'azote et améliore la production de biomasse des légumineuses. De ce fait, elle permet à la légumineuse d'introduire de l'azote dans le système et, lorsque la fixation est bonne, le caféier bénéficie des entrées d'azote dues à la fixation biologique par la légumineuse dans des proportions non négligeables.

On est donc en mesure de proposer aux agriculteurs un système cultural associatif que l'on peut rendre efficace et qui est plus facile à gérer que la technique traditionnelle du paillage. ■

## Bibliographie / References

- BOUHARMONT P., 1979. L'utilisation des plantes de couverture et du paillage dans la culture du caféier Arabica au Cameroun. *Café Cacao Thé* 23 (2) : 75-102.
- CARVAJAL J.F., 1984. *Cafeto - cultivo y fertilización*. 2<sup>a</sup> edición. Berne, Suisse, Institut international de la potasse, 254 p.
- DOMENACH A.M., 1987. Estimation de la fixation symbiotique chez des plantes herbacées et ligneuses : utilisation et validité de la méthode basée sur la mesure des abondances isotopiques naturelles de l'azote. Thèse de doctorat, université Claude Bernard, Lyon, France, 193 p.
- EGOUMENIDES C., 1990. Fractions de l'azote organique dans les sols tropicaux et fertilité azotée. In : *Agronomie et ressources naturelles en régions tropicales*. Actes des journées de la DRN, Montpellier, France, 12-15 sept. 1989. Montpellier, France, CIRAD-IRAT, p. 317-326.
- FRIED M., MIDDLEBOE V., 1977. Measurement of amount of nitrogen fixed by a legume crop. *Plant Soil* 47 : 713-715.
- GAJE W., FLÉMAL J., 1988. La culture du caféier d'Arabica au Burundi. Bruxelles, Belgique, AGCD, publication du service agricole 14, 198 p.
- GRAHAM P.H., SADOWSKY M.J., KEYSER H.H., BERNET Y.M., BRADLEY R.S., COOPER J.E., DE LEY D.J., JARVIS B.D.W., ROSLYCKY E.B., STRIJDOM B.W., YOUNG J.P.W., 1991. Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root and stem nodulating bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41 (4) : 582-587.
- HARDY R.W.F., HOLSTEN R.D., JACKSON E.K., BURNS R.C., 1968. The acetylene-ethylene assay for  $N_2$  fixation : laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.* 43 : 1185-1207.
- KAMPRATH E.J., 1970. Exchangeable aluminium as a criterion for liming leached mineral soils. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 34 : 252-254.
- SNOECK D., BITOGA J.P., BARANTWARIRIJE C., 1994. Avantages et inconvénients de l'utilisation des divers modes de couvertures dans les caféières au Burundi. *Café Cacao Thé* 38 (1) : 41-48.
- SNOECK D., 1995. Interaction entre végétaux fixateurs d'azote et non fixateurs en culture mixte : cas des *Leucaena* spp. associés à *Coffea arabica* L. au Burundi. Thèse de doctorat, université Claude Bernard, Lyon, France, 199 p.
- SNOECK J., 1961. L'amélioration des méthodes culturales du caféier d'Arabica à Mulungu. *Bulletin d'Information de l'INEAC* 10 : 53-68.

# Beneficial effects of *Leucaena* *Rhizobium* association on coffee in Burundi

Snoeck D.

CIRAD-CP, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, France

Coffee tree productivity depends on the quantity of organic matter and nitrogen available in the soil (Snoeck, 1961; Carvajal, 1984). In Burundi (map), these nutrients are provided by mulching coffee trees with grasses or crop residues taken from neighbouring fallow; this also offers the advantage of protecting against soil erosion and evaporation in the dry season.

Unfortunately, the bottomlands or hilltops where growers usually obtained their grass for mulching are increasingly being exploited. Growers therefore have to produce their own mulch, which is labour-intensive and transfers fertility from neighbouring plots to the coffee trees.

Planting a legume crop in hedges in the coffee interrows reduces fallow, labour requirements and transfer of fertility whilst maintaining the advantages of mulching. The legume must not compete with the coffee trees for light, water or mineral nutrients (Snoeck, 1961). It also has to produce enough plant matter to protect against erosion and evaporation in the dry season (Carvajal, 1984; Gaie and Flémal, 1988).

However, biological nitrogen fixation varies from one region to another. An absence of nitrogen fixation is linked to poor nodulation and generally acid soils desaturated in exchangeable bases. The effect of the legume crop on coffee yields depends on its ability to fix atmospheric nitrogen. The amount of nitrogen fixed depends on the choice of the two partners in symbiosis: the *Rhizobium* strain and the plant.

Snoeck *et al.*, 1994 showed that legume use is economically cost-effective in Burundi, even in the event of slight competition between the two plants, because of the labour savings resulting from the association (photo 1).

A sustainable and effective associative system requires:

- an appropriate legume;
- optimum biological fixation of nitrogen;
- transfer of the nitrogen fixed by the legume to the coffee tree;
- cultural techniques suited to the constraints of the association.

These four aspects were studied in laboratory and field trials in the main three coffee growing regions (table 1) at the following centres:

- Isale - Mumirwa region - adequate rainfall, but severely eroded soils on the steep slopes of this region;
- Rukoba - Kirimiro region - inadequate rainfall and highly acid and desaturated soils;
- Kayanza - Buyenzi region - good rainfall, soils moderately saturated in mineral elements and moderately acid.

## Choice of appropriate legume

Coffee trees can be combined with annual legumes (*Mimosa*, *Stylosanthes*, *Tephrosia* or *Crotalaria*), or pluriannual legumes (*Desmodium*, *Leucaena* or *Flemingia*) (Bouharmont, 1979).

Three legumes have been tested:

- *Desmodium* produces abundant biomass, which provides organic matter, but in many regions where there is a rainfall deficit, competition with the coffee trees for water can be observed;
- *Leucaena* and *Flemingia* barely compete with the coffee trees at all. They also help to control erosion with their deep taproot system. However, *Flemingia*, which was introduced into Burundi recently, seems to be quite difficult to grow. Two *Leucaena* species are recommended: over 1,500 m, *Leucaena diversifolia*, under 1,500 m, *Leucaena leucocephala*.

During surveys, *Leucaena diversifolia* was seen to fix nitrogen very well; a *Rhizobium* strain that seems to be adapted to it was isolated from its roots. As most coffee plantations are 1,500 m above sea level or more, we used this legume and this bacterium to study nitrogen fixation and its transfer from the legume to coffee.

## Optimizing nitrogen ( $N_2$ ) fixation

With a view to improving  $N_2$  fixation, studies were carried out to identify the *Rhizobium* strain forming nodules on *Leucaena*, and to search for its existence and competitiveness in the various coffee growing soils. Factors improving the development of this strain were then studied in the laboratory on the bacterium alone (without the plant), in the greenhouse or in the field combined with *Leucaena*.

## Identification of the *Rhizobium* isolated from *Leucaena* in Burundi

Information about the bacterial genome is provided by the structure of the proteins, the chemical composition of cellular elements, and by its phenotypic, morphological, enzymatic and nutritional characters. There are several ways of identifying bacteria: each carries one or more items of information on the taxonomic position of the bacterium (Graham *et al.*, 1991).

*Rhizobium* strain IRAT K156, isolated in Burundi, cannot be classed in any known group (photo 2). It is similar to another strain forming nodules on *Leucaena* in Bhutan (KL4) and to a group containing two *Rhizobium phaseoli* and the reference strain *Rhizobium tropici* (CIAT 899).

## Competitiveness of the *Rhizobium* strain isolated in Burundi

*Rhizobium* strain IRAT K156 was sought in the different soils of Burundi and its competitiveness was compared to that of two commonly used *Leucaena* species. Three *Leucaena* (two *L. diversifolia* and one *L. leucocephala*) were sown in three soils from the three research centres. Three treatments were applied for each species and each soil:

- no inoculation (natural nodulation from strains existing in the soil);
- inoculation of 1 ml/sachet of solution containing  $10^3$  bacteria (IRAT K156) per ml;
- inoculation of 1 ml/sachet of solution containing  $10^9$  bacteria (IRAT K156) per ml.

After 4 months, the local strain was detected using a serum created specifically for this strain on 30 nodules per treatment and the nitrogen fixing capacity was measured. The results of the analysis to determine the percentage of nodules carrying the strain in the different treatments are shown in figure 1.

The  $N_2$ -fixing activity was measured by the acetylene reducing assay (ARA) method described by Hardy *et al.* (1968) (figure 2). A very good correlation was found between the number of nodules containing the bacterium and  $N_2$ -fixing activity, particularly in *Leucaena diversifolia*. These two factors were therefore strongly correlated to each other.

The local *Rhizobium* strain (IRAT K156) therefore exists and is competitive in the soils of all three regions.

## Effect of environmental factors on bacterial multiplication and growth

The performance of the *Rhizobium* strain IRAT K156 with respect to acidity and to the phosphorus and aluminium contents was studied in a Yeast Extract Manitol (YEM) based culture medium. Identical treatments were carried out



on a reference strain specific to *Leucaena* imported from Australia: strain TAL 582.

The comparison between treatments was based on the optical density of the culture medium in relation to strain culture and growth.

A pH of 5.0 was an indispensable minimum to ensure the growth of the two strains (figure 3). Above that threshold, strain TAL 582 reached its optimum growth, whereas strain K 156 remained sensitive to an increase in pH up to 6.5.

As regards the effect of phosphorus, 114 ppm was the normal rate, and lower quantities simulated a deficiency in this element (figure 4). A lack of phosphorus considerably slowed down K 156 growth. The same responses were seen for strain TAL 582, but it was less sensitive to phosphorus deficiency.

For the aluminium effect, 0 ppm was the normal rate, with higher rates simulating toxicity for this element (figure 5). Aluminium toxicity considerably slowed down K 156 growth and even prevented its multiplication. Here too, TAL 582 only reacted to severe constraints.

The local *Rhizobium* strain (K 156) was more demanding in medium acidity and more susceptible to a phosphorus deficiency and aluminium toxicity than strain TAL 582. However, both bacteria required growth media that were not too acid, without aluminium toxicity and with a minimum phosphorus content.

As most of the soils used for coffee cultivation in Burundi do not satisfy these conditions, this may explain the heterogeneous nodulation seen in the surveys.

### Effect of fertilizers on legume biomass and the quantity of nitrogen fixed

We studied the effect of soil amendment by phosphate and calcium-magnesium fertilizers and a combination of the two on biomass, nodulation and the quantity of nitrogen fixed by the *Rhizobium/Leucaena* pair. The treatments were replicated for the Rukoba and Isale soils. The magnesian lime application rates were calculated in accordance with the amounts of exchangeable aluminium to be neutralized by the Kamprath method (1970). The (triple super) phosphate application rates were calculated according to the levels of this nutrient in the soil to reach (or exceed) 50 ppm of P exchangeable in the soil. At Rukoba, an application of 4.2 g of lime and 0.2 g of phosphate per sachet raised the pH to 5.3; base saturation to 32%; Ca to 1.6 meq/100 and P contents to 100 ppm. At Isale, an application of 3.1 g of lime and 0.4 g of phosphate raised the pH to 6.1; base saturation to 93%; Ca contents to 3.2 meq/100 and P contents to 135 ppm. The mean biomasses for the 4-month-old *Leucaena* plants are given in figure 6.

In the very acid ( $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}} = 4.5$ ) and desaturated (base saturation = 2%) Rukoba soils, lime and phosphorus applications had a very clear effect. A combination of the two fertilizers gave the best results. In the less acid ( $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}} = 4.8$ ) and less desaturated (base saturation = 14%) Isale soil, lime application alone gave results equivalent to a combination of the two nutrients.

The quantities of nitrogen fixed were determined by measuring biomass, total nitrogen rates and fixed nitrogen rates (figure 7) for 4-month-old plants.

Nitrogen rates were measured by the natural  $^{15}\text{N}$  abundance technique, which gives the overall percentage of nitrogen fixed over the entire growth period. The method is based on the fact that the percentages of  $^{15}\text{N}$  isotopes in the air and soil are different. Thus, when a legume is capable of fixing atmospheric nitrogen, it will have an intermediate rate of  $^{15}\text{N}$  isotopes that will be closer to that of the air the greater its fixing capacity (Fried and Middleboe, 1977). This method was shown to be valid for woody plants by Domenach (1987).

In Rukoba soil, *Leucaena* fixed virtually no nitrogen. Correction with lime alone already enabled the TAL 582 strain to fix nitrogen, which confirmed the lower requirements of this strain observed in the laboratory. As soon as the soil was corrected by phosphate applications, the local strain proved to be as effective as the other. A combination of both nutrients gave the best results.

In Isale soil, the same results were obtained in the control as in Rukoba soil with lime applications. Phosphate application made the local strain as effective as the imported strain. Phosphorus was less of a limiting factor, so lime application alone produced the same results as the lime plus phosphorus combination at Rukoba. The combination of both nutrients did not lead to any significant improvement, which shows that the required thresholds were virtually reached in that soil.

Correcting the acidity and phosphorus content of the soil improved nitrogen fixation and proved more effective than inoculation with an imported strain. It will therefore not be necessary to inoculate, but fertilization will often be useful in providing the right conditions for the bacterium to ensure optimum nitrogen fixation.

### Impact of the legume on coffee

In the first trial, we measured the impact of the legume on the amount and availability of nitrogen in the soil from the direct contribution via the soil of the roots and root exudates and the contribution of prunings. Then, in a second trial, coffee tree use of the nitrogen was measured by observing nitrogen flow.

### Ability of the legume to supply nitrogen to the farming system

A trial compared:

- coffee trees drawing all their nitrogen from the soil reserves;
- coffee trees benefitting from nitrogen fixed by the legume through cohabitation of the root systems;
- coffee trees benefitting from nitrogen fixed by the legume as above and also nitrogen from prunings returned to the system.

The nitrogen fractions were analysed using the method described by Egoumenides *et al.* (1990). The treatments were chosen so as to distinguish between the different ways in which nitrogen was transmitted to the coffee trees.

*Leucaena* improved the amounts of total nitrogen in the soil (table 2). The fact that it was primarily the hydrolysable part that increased indicated that there was more effective microbial activity in the soil. The beneficial effect of litter (prunings) was seen in the amounts of mineral nitrogen measured.

### Coffee tree use of nitrogen from legumes or from urea

The way coffee trees used nitrogen provided by legume prunings was measured by depositing *Leucaena* litter enriched beforehand in  $^{15}\text{N}$  isotopes at the foot of a few coffee trees isolated by metal sheets pushed into the ground. Nitrogen movement was monitored and the amounts of nitrogen taken up by the plant and remaining in the soil were measured. The same was done for *Desmodium* litter and the two sources of plant nitrogen were compared to nitrogen provided in urea form. These treatments were compared with coffee trees drawing all their nitrogen from the soil reserve. This control treatment also indicated the natural isotopic abundance of nitrogen in the soil and in the plant. The litter and urea were left for a year. Soil samples were then taken and the coffee trees were pulled up, weighed and analysed.

In one year, the coffee trees used 7 to 8% of the nitrogen provided by prunings and almost 23% of the nitrogen provided by the urea (figure 8). Almost 90% of the nitrogen from the two plant sources remained immobilized in the soil, as opposed to only 31% of the nitrogen from urea. The remainder was lost for the crops (i.e. 3.3% and 46% respectively).

In order to measure the residual effect of the nitrogen from these three sources, young coffee trees were replanted and left to grow for a year. The trees were still using 4 to 5% of the nitrogen provided by the legume prunings or urea (figure 9). However, the *Leucaena* nitrogen mineralized much more slowly than that from *Desmodium*, whilst the nitrogen from the urea



was virtually no longer leached. It seems that, in the latter case, the balance with the soil nitrogen had been virtually reached.

It can therefore be said that using the legumes indeed enriched the soils in nitrogen. That supplied to the soil by the legumes was primarily retained in hydrolysable form (hence available to the crops). Returning prunings to the system increased the mineralization capacity of the soil and the amounts of nitrogen fixed by the plant; the quality of the organic matter depended on the type of legume used: bushy legumes have a longer-lasting after-effect.

### Effect of cutting

#### *Leucaena* on nitrogen fixation

We studied the effect of cutting *Leucaena* on the number and weight of nodules and on nitrogen fixing activity (measured by the ARA method). *Leucaena* plants were grown in a greenhouse for 1 1/2 years. Some of them were cut 10 cm from the ground every four months (pruned plants), whereas the others were not cut (unpruned).

When the aerial parts of the plants were cut, there was a substantial drop in the quantity of nodules and in nitrogen fixing activity (measured by the ARA method), after different periods (figure 10). It took almost three months for the quantity of nodules and nitrogen fixing activity to return to normal.

Plant pruning is necessary to prevent their becoming bulky and competing for light, but pruning too frequently (at intervals of less than three months) prevents *Leucaena* plants from fixing nitrogen.

This study showed the need to find a less traumatic technique than the one currently used, so as to preserve the microbial activity responsible for biological nitrogen fixation (keeping a sap-drawer branch, higher pruning, etc.), thereby avoiding the need for the plant to draw on its reserves to produce new shoots.

### Conclusion

*Leucaena* is suitable for growing with coffee, since it provides organic matter and fertilizing

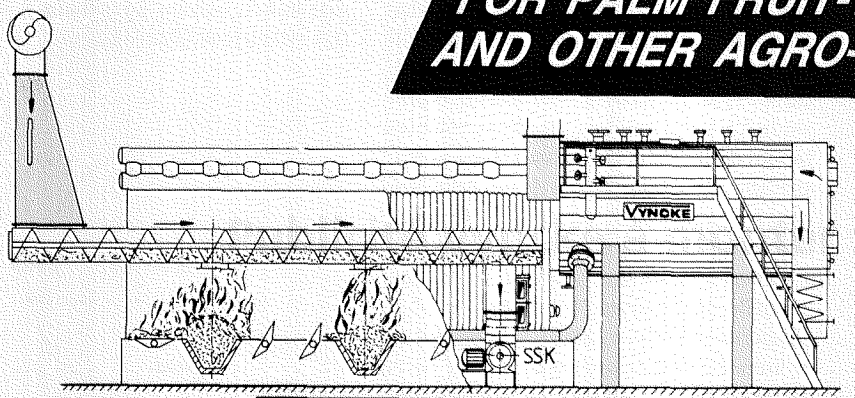
nutrients, and protects the soil from erosion and evaporation in the dry season.

All the *Rhizobium* strains associated with *Leucaena* required improved soil fertility to be effective and, once the soil has been corrected, the native strains perform as well as imported strains. If this plant is used, it will not be necessary to inoculate it, but adequate fertilization will be required. Corrective application rates for phosphorus and calcium were defined.

Soil improvement favours microbial activity associated with biological nitrogen fixation and increases legume crop biomass production. It therefore enables the legume to introduce nitrogen into the system and, when fixation is good, coffee trees benefit from nitrogen input in substantial proportions derived from biological fixation by the legume.

It is therefore possible to propose an intercropping system to farmers that can be made efficient and that is easier to manage than the traditional mulching technique. ■

## VYNCKE BOILERS: SPECIALLY DESIGNED FOR PALM FRUIT-WASTE AND OTHER AGRO-WASTE



capacities  
0.5 - 35 tons/h

- Combined water tube-fire tube boiler: sturdy, reliable design offering easy access and maintenance.
- Underfeed stoker: stable and complete combustion.
- Ash removal by dumping grate.
- Preassembled in our workshops: simple erection on site.

Over  
1,000 references  
in solid fuel  
combustion.

QUALITY SINCE 1912

# VYNCKE®

vyncke nv  
gentssesteenweg 224  
b-8530 harelbeke - belgium  
tel (32.56) 71 82 31  
fax (32.56) 70 41 60